维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)04－0402－03

麦芽凝集素沉淀法检测骨碱性磷酸酶同工酶及应用

王 华[1],黎海芪[1],杨锡强[2],李继斌[1],瞿 平[2],刘 瑜[2],胡 怡[3]

(1.重庆医科大学儿科学院儿保科;2.儿科研究所;3.检验科 重庆 400014)

【摘 要】目的:应用麦芽凝集素(WGA)沉淀法检测骨碱性磷酸酶同工酶(B－ALP)水平,并探索 B－ALP 与骨矿含量的相关性。方法:建立维生素 D 和钙缺乏所致的佝偻病动物模型,测定骨矿含量和血清钙、磷、25－OHD_3、总碱性磷酸酶(T－ALP)水平;采用 WGA 沉淀法检测不同生长阶段大鼠血清中的 B－ALP 活性。结果:血清 B－ALP 在佝偻病组明显升高,且出现时间较 T－ALP 早;B－ALP 与同期骨矿含量呈显著负相关。结论:血清 B－ALP 活性是反映成骨细胞功能更为敏感和可靠的指标。

【关键词】碱性磷酸酶;同工酶;骨矿含量;佝偻病

【中国图书分类法分类号】R723.25;Q5－3 【文献标识码】A 【收稿日期】2000－11－29

Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by wheat－germ lectin precipitation

WANG Hua, et al

(Department of Child Health Care, College of Pediatrics, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To determine the serum levels of bone alkaline phosphatase(B－ALP) by means of wheat－germ lectin precipitation and explore correlation between B－ALP and bone mineral content. ***Methods***: The animal model with calcium and vitamin D deficient rickets were established. Serum levels of calcium, phosphorus, 25－OHD_3, total ALP and bone ALP in different growth phase were assayed. ***Results***: Bone ALP activity was significantly increased in rickets group and this increase occurred earlier than that of the total ALP. There was a significant negative correlation between bone ALP and bone mineral content. ***Conclusion***: Serum bone ALP activity is a sensitive and reliable index in measuring osteoblastic activity.

【Key words】 Alkaline Phosphatase; Isoenzymes; Bone mineral content; Rickets

血清总碱性磷酸酶水平是临床上佝偻病及其它骨骼疾病诊断和判断治疗效果的常用生化指标。但在血清中存在肝、骨、肾、小肠和胎盘五种形式的同工酶,因此,血清总 ALP 检测缺乏特异性。循环中的 ALP 以骨和肝 ALP 为主,它们由同一基因编码,只是转录后糖基侧链的修饰不同,因而很难将它们区分开来[1]。B－ALP 由成骨细胞所分泌,与骨代谢密切相关,定量测定血清中 B－ALP 含量不仅能反映成骨细胞的功能状态,而且也有助于疾病的诊断和疗效监测。为此,我们采用麦芽凝集素(wheat－germ agglutinin)沉淀法观察了钙和 VitD 缺乏所引起的佝偻病动物模型血清中的 B－ALP 水平。

作者介绍:王 华(1963－),男,副教授,博士,四川人,主要研究方向:儿童骨骼生长发育及调控机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

佝偻病动物模型按本室建立的方法进行[2],即 21～23 日龄 Wistar 断乳雄鼠 30 只,平均体重 67.1g,随机分为两组。A 组为正常组(饲料含钙 0.5%, VitD 2000IU/kg);B 组,佝偻病组(饲料含钙 0.1%,不含 VitD)。两组动物分别饲养于塑料笼中,以 A 组每日摄入量为标准,控制 B 组进食量与 A 组一致,自由饮去离子水,其中 B 组采用避光喂养。实验周期为 42 日(6 周),两组分别于实验开始、3 周、6 周各处死 1/3 幼鼠,血标本用于检测钙、磷、25－OHD_3、T－ALP 及 B－ALP 水平。右胫骨用于测定骨矿含量。

1.2 实验指标及方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.1 血清总钙、离子钙、血磷测定 常规生化法。

1.2.2 血 25－OHD_3 测定：HPLC 法。色谱条件：流动相：甲醇/水＝84/16，流速：1.0ml/min，紫外检测波长：254nm。

1.2.3 总碱性磷酸酶测定：T－ALP 活性测定采用酶动力学方法，试剂盒购自上海长征公司，底物为对－硝基本苯磷酸，缓冲液为 Tris－碳酸盐缓冲液，Humalyzer2000（德国 Human）自动生化分析仪上检测。

1.2.4 骨碱性磷酸酶同工酶测定 参照 Behr 等[3]介绍的方法进行。样本血清 100μl 加入 10μl 浓度为 20g/L 的 Triton X－100，37℃孵育 30min，经预处理后的血清再与浓度为 5g/L 的 WGA（Sigma 公司）100μl 混合，37℃ 孵育 30min，2000×g 离心 10min，测定上清中的 ALP 活性。

结果计算：B－ALP＝T－ALP－2.1×上清 ALP。

1.2.5 热失活实验 3 份孕妇血清各 500μl 置 65℃ 中水浴 5min，检测其水浴前后 T－ALP 水平并再用 WGA 沉淀法检测其水浴后 B－ALP 活性。

1.2.6 准确度和重复性实验 取同一血清反复用 WGA 沉淀法测定其 B－ALP 五次，计算 CV 值。脐血 5 份（取自本校第二临床学院产科病房顺产或剖宫产新生儿），测定其 T－ALP 及 B－ALP 水平。

1.2.7 骨矿含量测定 动物处死后，剥离右侧胫骨，经烤箱烘干，己烷、乙醚脱脂，然后置于 550℃ 的马弗炉中消化 36h。收集骨灰并称重。

1.2.8 统计学处理 采用 SPSS 8.0 统计软件包，实验数据均数间的比较用 t 检验，相关分析用直线回归，$\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 WGA 沉淀法的准确度和重复性 孕妇血清经热失活处理使其肝 ALP 和 B－ALP 失活，此时血清中存在的 ALP 主要为胎盘 ALP。再经 WGA 沉淀，其 B－ALP 值为 0.3±0.44U/L，说明 WGA 法几乎不沉淀胎盘来源的 ALP，显示出较高的特异性。为了解 WGA 法沉淀骨 ALP 的程度及准确性，我们同时测定了 5 例脐血标本中的 T－ALP 及 B－ALP 水平，因为脐血中一般只含有一种 ALP 同工酶，即 B－ALP[3]。结果脐血中 T－ALP 的水平为 113～142U/L，经 WGA 沉淀后，B－ALP 的沉淀率达 95.2%±4.2%（表 1）。同一血清标本重复检测 B－ALP 五次，结果为 334.62±12.44（U/L），其批内 CV 为 3.72%。

表 1 孕妇血清热失活实验及脐血 B－ALP 沉淀结果

血清来源		总 ALP	热失活后总 ALP	热失活后 B－ALP	B－ALP 沉淀率	
		U/L	U/L	U/L	U/L	%
孕妇血清	1	194	152	0.8		
	2	81	40	0.1		
	3	290	212	0		
脐血	1	130			121.6	93.5
	2	113			113	100
	3	120			115.8	96.5
	4	142			137.8	97
	5	114			101.4	88.9

表 2 各组血生化改变

	实验开始				实验 3 周				实验 6 周			
	总钙	离子钙	血磷	25OHD_3	总钙	离子钙	血磷	25OHD_3	总钙	离子钙	血磷	25OHD_3
	(mmol/L)			(mmol/L)	(mmol/L)			(mmol/L)	(mmol/L)			(mmol/L)
A 组	2.22±0.16	1.12±0.16	3.84±0.78	41.17±8.40	1.92±0.19	1.23±0.10	3.19±0.27	42.09±11.76	2.44±0.07	1.26±0.04	3.26±0.58	42.88±6.52
B 组	2.15±0.18	1.11±0.13	3.79±0.17	43.27±7.03	1.68±0.18**	0.85±0.05**	2.77±0.16*	10.69±6.15**	1.16±0.08**	0.63±0.03**	2.43±0.33**	16.95±6.70**

与 A 组相比 *$P<0.05$；**$P<0.01$

2.2 骨代谢异常动物血生化的改变 实验开始，两组间血生化值无差异。而实验 3 周后，佝偻病组大鼠血清钙、磷、25－OHD_3 均出现了不同程度的变化（表 2）。血清总钙、离子钙、25－OHD_3 水平显著降低（$P<0.01$），尤其以离子钙随实验期的延长呈进行性下降。血磷在实验中期和末期与正常组相比也明显降低（$P<0.05$），说明实验组伴有继发性甲状旁腺功能亢进的表现。

2.3 T－ALP、B－ALP 活性及与骨矿含量的相关性 与上述生化指标相似，两组 T－ALP、B－ALP 和骨矿含量基础值无明显差异。虽然实验组骨矿含量在中期就已显著下降，但此时血清 T－ALP 仅略有上升，无统计学意义，直到末期才显著升高。而 B－ALP 活性在中期即明显上升，到了实验末期更加显著（表 3），表明 B－ALP 在反映佝偻病骨骼代谢及病理改变上较 T－ALP 更为敏感。实验中、末期 B－ALP 水平与同期骨矿含量呈显著的负相关（$r=-0.588$ 及 -0.939，$P<0.05$ 及 0.01）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 各组碱性磷酸酶及骨矿含量

	实验开始			实验 3 周			实验 6 周		
	T-ALP (V/L)	B-ALP (U/L)	骨矿含量 (g)	T-ALP (V/L)	B-ALP (U/L)	骨矿含量 (g)	T-ALP (V/L)	B-ALP (U/L)	骨矿含量 (g)
A 组	354.68±125.29	232.29±75.83	0.053±0.007	632.40±165.88	215.34±21.06	0.126±0.008	381.08±90.40	151.89±54.05	0.224±0.008
B 组	346.78±75.70	195.52±61.06	0.057±0.021	717.08±141.85	379.95±92.93*	0.076±0.022**	780.60±192.45**	392.73±80.51**	0.105±0.011**

与 A 组相比 $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$

3 讨 论

碱性磷酸酶是一种糖蛋白,由至少四个基因位点编码,检测其血清中的水平一直被广泛用于骨骼、肝脏等疾病的诊断和疗效监测。由于血清中存在五种形式的同工酶,尤其是肝和骨碱性磷酸酶在结构上极其相似,因此,血清总碱性磷酸酶水平的检测缺乏特异性,且不能指示病因。至今尚无满意的区分这几种同工酶的技术方法。传统的热失活法其检测结果准确度差,且易受干扰;电泳法虽能区分肠、胎盘来源的同工酶,但骨和肝同工酶的电泳条带重叠,不易准确定量;放射性免疫分析法中,骨和肝同工酶之间存在交叉反应[4]。1984 年,Rosalki 等[5]首次报道了用麦芽凝集素沉淀法检测骨碱性酸酶同工酶,并由 Behr 等[3]加以改进,它利用 WGA 与骨特异性碱性酸酶上的 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰甘露糖胺丙酮酸结合而将其沉淀下来,现已得到广泛采用。

在佝偻病时,长骨干骺端钙化受阻,大量骨样组织堆积,成骨细胞增生活跃,而 B-ALP 由成骨细胞所分泌,能及时反映成骨细胞的活性。本实验应用 WGA 沉淀法检测佝偻病动物模型血清中的 B-ALP,结果在实验中期其水平就显著高于正常组,出现升高的时间早于 T-ALP,且与同期的骨矿含量呈负相关。因此,测定血清中的 B-ALP 活性,有助于佝偻病的早期诊断。

目前,常用于反映骨形成率的指标有骨钙素和 B-ALP,测定血清中的 B-ALP 具有如下的优点[6]:①B-ALP 半衰期相对较长,昼夜节律变化较小,而骨钙素每天的变化高达 30%。②B-ALP 能有效地反映骨形成率。③B-ALP 的活性能经受长时间冻存和反复冻融。以往在骨质疏松症的诊断和疗效监测中,依赖骨密度的测定,但骨密度的变化很慢,因此,B-ALP 的检测为临床提供了一种早期诊断和判断疗效的指标。Crofton 等[7]对生长迟缓儿童的身高与 B-ALP 活性的关系进行了纵向研究,结果发现血清 B-ALP 活性与儿童身高的增长速度密切相关,因而 B-ALP 还可用于儿童的生长监测。

总之,血清 B-ALP 比总 ALP 更为敏感地反映疾病中骨的代谢、成骨细胞功能状况及治疗效果,而 WGA 沉淀法的操作简便、特异性和灵敏度较好,适用于常规实验室的应用和推广。

参 考 文 献

[1] Smith M, Weiss MJ, Griff CA, et al. Regional assignment of the gene for human liver bone kidney alkaline phosphatase to chromosome $1p^{36.1-34}$[J]. Genomics, 1988; 2(2): 139-143.

[2] 黎海芪, 暨 平, 张 庆, 等. 对长期低钙摄入幼鼠的骨骼的研究Ⅲ: 低钙时幼鼠的骨钙素水平[J]. 中华儿童保健杂志, 1996, 4(4): 245-247.

[3] Werner Behr, Jurgen Barnert. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility[J]. Clin Chem, 1986, 32(10): 1960-1966.

[4] F Rauch, B Middelmann, M Cagnoli, et al. Comparison of total alkaline phosphatase and three assays for bone-specific alkaline phosphatase in childhood and adolescence[J]. Acta Paediatr, 1997; 86(6): 583-587.

[5] Rosalki SB, Ying Foo A. Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma[J]. Clin Chem, 1984; 30(7): 1182-1186.

[6] John Farley, David J. Baylink. Skeletal alkaline phosphatase activity in serum[J]. Clin Chem, 1995; 41(11): 1551-1553.

[7] Crofton PM, Stirling HF, Kelnar CJH. Bone alkaline phosphatase and height velocity in short normal children undergoing growth-promting treatment: Longitudinal study[J]. Clin Chem, 1995, 41(5): 672-678.